

# **Schlussbericht**

für das Teilvorhaben

## **Entwicklung und Funktionsnachweis von Strukturierungsverfahren auf der Basis der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) zur Generierung von biphasischen Systemen für Knochen-Knorpelimplantate**

Förderkennzeichen: 13N10035

im Verbundprojekt

## **Biofunktionale und mittels 2-Photonen-Polymerisation (2PP) nanostrukturierte Implantate zur Stimulation der Osteo- und Chondrogenese bei der Behandlung von skeletalen Defekten (BioNanoPlant)**

Laufzeit: 01.09.2008 – 29.02.2012

Autoren: Silke Fiedler  
Ronald Schade  
Klaus Liefeith

Heiligenstadt, 29.08.2012

**Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V.**  
Heilbad Heiligenstadt



## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>I. Kurze Darstellung</b>	
<b>1. Aufgabenstellung</b>	3
<b>2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde</b>	4
<b>3. Planung und Ablauf des Vorhabens</b>	4
<b>4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde</b>	6
<b>5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b>	9
<b>II. Eingehende Darstellung</b>	
<b>1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse</b>	10
1.1 Entwicklung eines 2-Photonen-Polymerisationsverfahrens für die Mikrostrukturierung von Hydrogelsystemen	10
1.2. Testung von Materialien zur Herstellung von Trägerstrukturen für die Osteo- und Chondrophase von biphasischen Implantaten	10
1.3 Zytokompatibilitätsprüfungen der Scaffoldmaterialien	23
1.4 Testung und Bereitstellung bioaktiver Oligopeptide zur Förderung der Zelladhäsion und Zelldifferenzierung	27
1.5 Bereitstellung biofunktionaler Leitstrukturen zur Optimierung der zellulären Adhäsion, Migration und Differenzierung	29
1.6 Degradationskinetik der Scaffoldmaterialien unter simulierten klinischen Bedingungen in Kombination mit der Freisetzung von bioaktiven Molekülen von der Scaffoldoberfläche	31
1.7 <i>In vitro</i> -Stimulation der Zelldifferenzierung autologer Zellen des skeletalen Systems mittels zyklischer mechanischer/hydrostatischer Kraffteinleitung	35
1.8 Analyse zelldifferenzierender Effekte 3D-mikrostrukturierter bioaktiver Oberflächen	37
1.9 Zusammenfassung und Wertung	41
<b>2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises</b>	42
<b>3. Notwendigkeit und Angemessenheit der Arbeit</b>	43
<b>4. Voraussichtlicher Nutzen und Ergebnisverwertung</b>	44
<b>5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte anderer Stellen</b>	45
<b>6. Veröffentlichung der Ergebnisse</b>	46
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	47

## I. Kurze Darstellung

### 1. Aufgabenstellung

Das Gesamtziel des Forschungsverbundvorhabens BioNanoPlant besteht in der Entwicklung von biofunktional modifizierten, biphasischen Knochen-/Knorpelimplantaten zur Behandlung von großflächigen osteochondralen Defekten wie sie z.B. bei fortgeschrittener Arthrose auftreten. Die Implantate sollen das Remodelling der defekten Osteo- und Chondrophase der Gelenke unterstützen, so dass nach Abbau des Implantats eine vollständige Regeneration des nativen Gewebes erreicht wird. Die unterschiedlichen Phasen des Implantats sollen dabei die Ausbildung des Knochengewebes (Osteophase) sowie des Knorpelgewebes mit seiner ausgeprägten extrazellulären Matrix (Chondrophase) fördern. Durch die Auswahl des Materials für die jeweilige Phase des Implantats, die Geometrie sowie durch biofunktionale Modifikation der jeweiligen Phase soll die Zelldifferenzierung im nachwachsenden Gewebe in die jeweilige Richtung, also in der Osteophase in Richtung Osteoblasten, in der Chondrophase in Richtung Chondrozyten induziert werden.

Die Zielsetzung des Teilprojektes am iba Heiligenstadt e.V. besteht in der Entwicklung eines 2-Photonen-Polymerisationsverfahrens zur Herstellung von Implantaten auf der Basis von biokompatiblen Polymeren zur Behandlung von Knochen-/Knorpeldefekten. Die Aufgabenstellung in diesem Teilprojekt enthält sowohl materialwissenschaftliche als auch zellbiologische Aspekte. Zum materialwissenschaftlichen Arbeitskomplex zählen die Erarbeitung von Techniken zur Herstellung von Scaffoldstrukturen mittels 2PP, Evaluierung der 2PP-Prozessparameter, Auswahl von mittels 2PP prozessierbaren Materialien und der (chemischen) Biofunktionalisierung der Scaffoldoberflächen. Die zellbiologischen Arbeiten umfassen die Beurteilung der Biokompatibilität der ausgewählten Materialien und Scaffoldgeometrien in Zellkultur, Untersuchungen zur Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung, Vergleich der Zelldifferenzierung im dreidimensionalen Scaffold zur 2D-Kultur, sowie der Einfluss der Applikation von mechanischer Stimulation mittels hydrostatischem Druck und biochemischer Stimulation durch die vom Scaffold freigesetzter Wirkstoffmoleküle auf die Zelldifferenzierung.

Im Rahmen eines „Proof-of-concept“ sollten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- A) Die Grundlagen sollten geschaffen werden, um biofunktional vorkonditionierte Knochenimplantate als biodegradierbare Osteophase mit interkonnektierenden Poren für die Behandlung von Knochengewebedefekten unterschiedlicher Größe mit Hilfe der 2-Photonen-Polymerisation herzustellen.
- B) Mit Hilfe der 2PP-Technik sollten biodegradierbare Chondrophasen mit offener, interkonnektierender Hydrogelstruktur synthetisiert und als bioaktive Scaffoldmaterialien mit der Osteophase kombiniert werden.
- C) Testung der Degradation der einzelnen Phasen unter klinisch simulierten Bedingungen
- D) Testung der Degradation der biphasischen Scaffoldmaterialien
- E) Testung der Zytokompatibilität sowie der Effekte auf die Zelldifferenzierung

## 2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde

Das Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. (iba) ist eine vom Freistaat Thüringen als außeruniversitäre Forschungseinrichtung institutionell geförderte Landesforschungseinrichtung. Der Fachbereich Biowerkstoffe hat eine ausgewiesene Expertise in der anwendungsorientierten Charakterisierung und Funktionalisierung von Biomaterialien bis hin zur normgerechten Medizinprodukteprüfung entsprechend DIN EN ISO 10993. Das Institut verfügt über die notwendigen methodischen und technischen Voraussetzungen für die Untersuchung von topographischen, oberflächenchemischen und -physikalischen Materialeigenschaften und die durch den Zell-Materialkontakt induzierten molekularbiologischen, mikrobiologischen und zellbiologischen Reaktionen.

Am iba ist seit Anfang 2008 eine 2-Photonen-Polymerisationsanlage M3DL verfügbar. Zur 2PP-Anlage gehört ein Präzisionsachsensystem der Firma Aerotech, Nürnberg. Die Steuersoftware der 2PP-Anlage wurde vom Laser-Zentrum Hannover entwickelt. Die 2PP-Anlage wird mit einem Ti:Sa-Femtosekundenlaser (Tsunami, Spectra Physics) betrieben, der gepulstes Laserlicht im Wellenlängenbereich von 690 - 1080 nm (Nahes IR) mit einer Pulsfrequenz von 82 MHz und einer Pulslänge von 80 -130 fs emittiert. Die Grundlagen für die Herstellung von 2PP generierten Teststrukturen basierend auf den Standardfunktionen der vorliegenden Steuersoftware, der Verwendung des Photoresists Ormocer® (micro resist technology GmbH) sowie methacrylierter Hydrogelmonomere waren etabliert.

Im Rahmen der BMBF-Förderinitiative „Biophotonic I“ wurden am iba umfangreiche Arbeiten zum Knorpel-Tissue Engineering durchgeführt (Projekt MEMO, FKZ 13N8435) und wesentliche Grundlagen zur Detektion und Auswertung von Autofluoreszenzsignalen dreidimensionaler Zellverbände mittels 2-Photonen-Mikroskopie (2PLSM) erarbeitet. Ferner bestanden methodische Erfahrungen im Knorpel-Tissue Engineering mit bovinen Chondrozyten unter Verwendung von kollagenen Trägermaterialien sowie Erfahrungen mit der Kultur von Osteoblasten-Zelllinien. Protokolle für die Zelldifferenzierungsanalyse auf der Basis von RT-PCR und immuno-histologischen Färbungen standen ebenfalls zur Verfügung. Des Weiteren wurde im Rahmen des Projektes MEMO ein Fließkammersystem zur Applikation von hydrostatischem Druck auf 3D-Zellaggregate mit Kopplung an das 2PLSM zur online-Detektion der Zellantwort entwickelt. Die Ergebnisse bildeten eine solide Basis für weiterführende Arbeiten zur mechanischen Zellstimulation. Insgesamt waren die infrastrukturellen und methodischen Voraussetzungen zur erfolgreichen Entwicklung von bioaktiven, biphasischen Implantaten auf der Basis der 2-Photonen-Polymerisation gegeben.

## 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Gesamtprojektvorhaben werden zwei Entwicklungslinien des Projektes verfolgt. Die erste Entwicklungslinie beinhaltet die Herstellung, Charakterisierung und den Wirksamkeitsnachweis von biologisch funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP-NP), das Ziel dieser Linie ist der Proof-of-concept für die mit rhBMP2 bzw. siRNA biologisierten CaP-Partikel und der Nachweis der biologischen Aktivität *in vitro* und *in vivo* im Rahmen der geplanten Tierversuche.

Für die zweite Entwicklungslinie mit der Zielsetzung der Entwicklung eines auf der 2PP basierenden Verfahrens zur Herstellung von Implantaten wurde ein Proof-of-Principle hinsichtlich der Prozessierung einer nanostrukturierten künstlichen 3D-ECM mittels 2PP-Prozess einschließlich des Nachweises der gewünschten Zelldifferenzierung innerhalb der hergestellten Scaffoldstruktur festgelegt.

Das Teilvorhaben am iba ordnet sich in die zweite Entwicklungslinie ein und besteht aus neun Arbeitspaketen, die die materialwissenschaftlichen und die zellbiologischen Aufgabenstellungen innerhalb des Teilvorhabens abdecken. Diese Arbeitspakete sind in der aufgeführten Tabelle (s.u.) mit der geplanten Zeitschiene dargestellt. Neben den Arbeitspaketen wurden für das Midterm-Meeting nach 18 Monaten zur Evaluierung des Projektstandes Meilensteine im Gesamtprojektantrag formuliert, deren Erfüllung als Kriterium für die Fortsetzung des Projektes festgesetzt wurde. In Bezug auf das Teilvorhaben am iba waren folgende Meilensteine durch dieses Teilvorhaben zu erfüllen:

**Meilenstein 3 (Gesamtprojektantrag):**

„Es soll eine arbeitsfähige photochemische 2PP-Methode für die Nanostrukturierung IR-transparenter Materialien etabliert werden. Um diesen Meilenstein zu erreichen wird mindestens ein optimiertes nanostrukturierbares Material für die Osteophase und ein nanostrukturierbares Chondrophasenmaterial auf Hydrogelbasis zur Verfügung gestellt.“

**Meilenstein 4 (Gesamtprojektantrag):**

„Die Arbeiten zur Materialauswahl im Hinblick auf Strukturierbarkeit und Biokompatibilität sollen abgeschlossen sein. Es wird die Bereitstellung von 2PP generierten Trägern der Osteo- und Chondrophase (jeweils getrennt nach Phase) für die zellbiologische Testung sichergestellt.“

Die Zusammenarbeit der Projektpartner während der Projektlaufzeit wurde durch den Netzplan incl. der Übergabepunkte und Meilensteine im Gesamtprojektantrag geregelt. Für das Teilprojekt am iba ergaben sich daraus folgende Interaktionen mit den Projektpartnern:

**INNOVENT Technologieentwicklung e.V.:**

- Zusammenarbeit bei der Entwicklung polymerisierbarer Materialien für die Osteo- und Chondrophase einschließlich der Entwicklung geeigneter Photoinitiatorsysteme
- Testung der 2PP-Prozessierung und Feedback an INNOVENT
- Bereitstellung geeigneter RGD-Motive zur Kopplung an die Osteophase

**co.don® AG**

- Bereitstellung von Trägern der Chondrophase für Untersuchungen bei co.don® AG zur Migration
- von Chondrozyten aus Sphäroiden und der Besiedlung der Chondrophase
- Bereitstellung von Trägern der Chondrophase für mechanische Druck- und Belastungsversuche bei der co.don® AG
- Bezug autologer Chondrozyten und Osteoblasten sowie von Sphäroiden für zellbiologische Applikationsstudien im iba
- Bereitstellung mechanisch stimulierter zellbesiedelter biphasischer Konstrukte für die immunhistologische Analyse bei der co.don® AG

**aap Biomaterials GmbH (incl. Universität Duisburg-Essen als Unterauftragnehmer)**

- Degradationsstudien an mehrschaligen CaP-Nanopartikeln unter klinisch simulierten Testbedingungen im iba und Feedback zur Optimierung der CaP-Komposite
- Herstellung von implantierbaren 2PP-Konstrukten zur Durchführung von *in vivo* Tierversuchen